



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

Insuficiência ovárica prematura: marcadores de reserva ovárica

Filomena Cristina Brás Santos

Maior2019



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

Insuficiência ovárica prematura: marcadores de reserva ovárica

Filomena Cristina Brás Santos

Orientado por:

Dr José Joaquim Domingues Nunes

Maio2019

Resumo

A insuficiência ovárica prematura é uma situação rara, mas com forte impacto quando presente. Esta deriva da diminuição ou mesmo falência de toda a reserva ovárica da mulher. A reserva ovárica abrange o potencial reprodutivo da mulher em função da quantidade e da qualidade de oócitos remanescentes.

Ao longo dos anos têm sido investigados vários possíveis marcadores para medir a reserva ovárica. No entanto, os atuais marcadores mais utilizados ou em vias de utilização na prática clínica medem apenas uma parte da reserva ovárica, ou seja, os folículos que se encontram em crescimento. Existe, portanto, necessidade de desenvolver marcadores que consigam medir o pool remanescente de folículos ováricos e idealmente ter uma noção sobre a sua qualidade.

Ao longo deste trabalho serão abordados os marcadores mais utilizados no dia-a-dia do clínico e os mais promissores atualmente, fazendo uma breve abordagem de outros marcadores a serem incluídos num futuro próximo.

Abstract

Premature ovarian insufficiency is a rare condition, but with a strong impact when present. This stems from the decrease or even failure of the entire woman's ovarian reserve. The ovarian reserve covers the reproductive potential of the woman as a function of the quantity and quality of remaining oocytes.

Over the years, several possible markers have been investigated to measure the ovarian reserve. However, the most commonly used or currently used in clinical practice measure only part of the ovarian reserve, that is, growing follicles. There is, therefore, a need to develop markers that can measure the remaining pool of ovarian follicles and ideally have a sense of its quality.

Throughout this paper, the most commonly used markers in the daily routine of the clinician and the most promising ones will be discussed, taking a brief approach to other markers to be included in the near future.

Palavras-chave: Insuficiência ovárica prematura, marcadores de reserva ovárica

Keywords: Premature ovarian insufficiency, ovarian reserve markers

O trabalho final exprime a opinião do autor e não da FML.

Índice

Introdução.....	6
Metodologia.....	8
Discussão.....	9
Marcadores de reserva ovária.....	9
FSH.....	11
Estradiol.....	13
CCCT.....	13
Inibina B.....	14
Volume ovário.....	15
AFC.....	15
AMH.....	17
Outros marcadores.....	21
Conclusões.....	23
Bibliografia.....	24

Introdução

A insuficiência ovárica prematura (IOP) define-se como uma diminuição da reserva do ovário que ocorre antes dos 40 anos de idade, no qual pode resultar numa menopausa precoce.¹

A prevalência de IOP estima-se ser de 1 a 3% em mulheres com menos de 40 anos e cerca de 0,1% em mulheres com menos de 30 anos.^{1, 2, 3, 4}

Em termos de etiologia, aproximadamente 90% das situações são idiopáticas. As restantes etiologias podem ser devido a causas genéticas, autoimunes ou secundárias (nomeadamente referente a quimioterapia (QT), radioterapia (RT) ou cirurgia abdomino-pélvica, por exemplo).⁴

Dentro da etiologia do foro genético, a causa mais frequente é a síndrome de Turner (incidência de 1/2500 mulheres). Outra causa frequente é a síndrome do X frágil, onde as mulheres afetadas com IOP são apenas as portadoras de pré-mutação (ou seja, quando existem 55 a 200 repetições dos nucleótidos CGG), onde em média atingem a menopausa 5 anos mais cedo do que as não portadoras.⁴

Relativamente à patologia auto-imune, esta é muitas vezes associada a IOP, nomeadamente: tiroidite autoimune (15%), diabetes *mellitus* tipo 1 (2,5%), hiperparatiroidismo, miastenia gravis, hipoplasia/aplasia tímica, doença de Crohn, vitiligo, anemia perniciosa, lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatóide, síndrome de falência poliglandular autoimune de tipo I e II, entre outros. A doença de Addison está presente em 3% dos casos de IOP.⁴

A nível de causas secundárias pode-se ressaltar as substâncias gonadotóxicas, onde os agentes alquilantes (por exemplo, a ciclofosfamida) são dos mais utilizados. Algo a ter em conta também são as terapêuticas com recurso a radioterapia, sendo fundamental, neste caso, expor o mínimo possível a região abdomino-pélvica. Os efeitos destas terapêuticas serão diferentes de acordo com vários fatores, tais como a idade da criança/mulher, dose, tempo de exposição e localização da irradiação. A nível cirúrgico, dependerá do procedimento que seja realizado (por exemplo ooforectomia bilateral vs unilateral), com todas as consequências que acarreta uma intervenção dessa natureza.⁴

O diagnóstico é clínico e integrado com métodos complementares de diagnóstico. Poderão estar presentes alterações do padrão menstrual (amenorreia/oligomenorreia em pelo menos 3 meses consecutivos). O diagnóstico laboratorial requer pelo menos 2 medições de FSH (ao 3º dia do ciclo), com 1 mês de intervalo entre as medições (valores entre 25-40 UI/L). O estradiol deverá ser <50 pg/mL (revelando hipoestrogenismo). Para uma avaliação mais completa, podem ser pedidas a hormona anti-mülleriana (AMH) e a inibina B. Por fim, pode ainda ser realizada a contagem de folículos antrais (AFC) através de ultrassonografia.^{1, 2, 5, 6, 7}

As consequências de uma IOP para uma mulher poder-se-ão manifestar a curto, médio ou longo prazo. Esta poderá apresentar sintomatologia vasomotora, irregularidades menstruais, sintomas génito-urinários, alterações do sono e do humor (com maior risco de depressão e ansiedade), alterações neurocognitivas (nomeadamente doença de Alzheimer), diminuição da massa óssea e osteoporose, alterações cardiovasculares (maior risco de doença coronária isquémica e doença cerebrovascular) e alterações oftalmológicas. A fertilidade destas jovens mulheres terá alterações, com uma diminuição ou mesmo incapacidade de engravidarem. Com tudo isto, haverá um forte impacto na qualidade de vida, pelo que é fundamental uma abordagem multidisciplinar e um acompanhamento regular.^{1, 2, 4, 6}

Em termos de terapêutica, esta deverá ser discutida com a paciente, mas no qual a terapêutica hormonal de substituição (THS) é o método de eleição. Como a menopausa ocorre precocemente, recomenda-se que a THS seja feita até à idade habitual da menopausa, ou seja, por volta dos 50 anos de idade. Tem diversas vantagens como o controlo dos sintomas vasomotores (a mais curto prazo) e na prevenção da maioria das consequências acima referidas na saúde da mulher.^{8, 9, 10}

O esquema terapêutico e as vias de administração da THS devem ser adequadas a cada caso, tendo em atenção que se devem manter valores mínimos de estradiol acima de 40 pg/mL. A adição de progestativos deverá ser enquadrado no contexto de cada paciente. Quanto à via de administração, a que tem demonstrado menos riscos e que mimetiza de forma mais aproximada os níveis hormonais é a via transdérmica.^{2, 11}

Existem outras terapêuticas complementares à THS: mudança do estilo de vida, antidepressivos, acupuntura, fitoestrogénios, suplementos alimentares, entre outros. No entanto, o grau de evidência da eficácia e segurança destas alternativas/complementos é

muito variável e os prós e contras da sua utilização devem ser devidamente esclarecidos e contextualizados.^{1, 2, 4, 10}

Por último, a IOP pode ocorrer antes da puberdade, tendo, portanto, interferência com um correto desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, crescimento do esqueleto e com presença de amenorreia primária. O regime terapêutico aconselhado é a administração de estrogénios (com um aumento gradual da dose a cada 3 a 6 meses) ao longo de 2 anos, a partir dos 12 anos. Os progestativos são adicionados aquando do início das menstruações para proteção do endométrio. Pode ainda ser administrada hormona de crescimento. Fundamentalmente, o que importa é que haja uma mimetização da puberdade normal. Caso o diagnóstico seja feito mais tardiamente, o esquema terapêutico pode ser acelerado de forma a não prejudicar o normal desenvolvimento pubertário.^{1, 6, 9}

Metodologia

Inicialmente foi realizada uma pesquisa geral sobre menopausa precoce com o objetivo de saber quais os atuais focos de investigação acerca do tema, onde após a análise de 20 artigos retirados do Pubmed decidiu-se abordar os marcadores de reserva ovárica. Desses artigos iniciais, apenas 11 foram incluídos na introdução do trabalho, uma vez que alguns dos artigos chegavam às mesmas conclusões.

A segunda pesquisa (direcionada à temática), também foi realizada no Pubmed utilizando os seguintes termos: “premature ovarian insufficiency”, “ovarian reserve”, “ovarian reserve testing”, “ovarian reserve biomarkers” e “ovarian aging”.

Com as seguintes restrições:

- Publicações dos últimos 5 anos
- Realizados em seres humanos
- Apenas em língua inglesa

Obtiveram-se 694 artigos no total da segunda pesquisa. Após uma leitura cuidada dos títulos e abstracts foram selecionados os mais relevantes, selecionando-se 141 artigos (que posteriormente foram lidos e analisados). Destes, para a realização da discussão,

apenas se incluíram 40 artigos (completando os 51 artigos presentes na bibliografia). Foram excluídos, os artigos que não cumpriam os critérios definidos e que não estavam relacionados com o objetivo do trabalho.

Discussão

Com a aplicação da metodologia mencionada acima, obtiveram-se os seguintes resultados:

Marcadores de reserva ovárica

Nas últimas décadas têm-se verificado uma alteração do padrão de reprodução no qual as mulheres protelam o nascimento do seu primeiro filho. Esta mudança deve-se a vários fatores entre os quais devido a alterações socio-económicas (progressão da carreira profissional, estabilidade económica, entre outros). Como tal, o adiamento da constituição de família pode revelar problemas de fertilidade quer por algo pré-existente quer pelo avanço da idade do casal (em particular a idade da mulher). Aqui coloca-se uma série de desafios tanto ao médico de medicina geral e familiar como ao ginecologista/obstetra: e se for uma situação de insuficiência ovárica prematura? Poderão estes clínicos ter marcadores acessíveis à clínica do dia a dia para assim poder canalizar este caso e ajudar da melhor forma possível o casal que têm à frente?

A possibilidade de uma mulher com IOP engravidar naturalmente ronda os 5 – 10 %.⁶ Poderão ainda recorrer a estimulação ovárica, aumentando essa probabilidade para os 20%, ou em último caso recorrer a oócitos doados.¹²

Assim, será deveras importante poder de alguma forma estimar a reserva ovárica, utilizando um método o menos invasivo possível, rápido, acessível e económico.

Primeiramente, há a definir o que se pretende efetivamente medir, ou seja, conceptualizar o conceito de “reserva ovárica”. Este é um termo que abrange o potencial reprodutivo da mulher em função do número e da qualidade dos oócitos remanescentes. Realizar a medição da reserva ovárica tem como objetivo principal avaliar quer a

quantidade quer a qualidade dos oócitos da mulher, tentando prever o potencial reprodutivo da mesma.¹³

Segundo Findlay et al, o termo “reserva ovárica” não é o mais adequado, uma vez que a verdadeira reserva ovárica representa apenas os oócitos quiescentes, ou seja, o pool de folículos primordiais que não estão em crescimento. Ainda segundo estes autores, o termo mais adequado deverá ser “potencial ovulatório”, dado que este indica uma parte específica do pool de folículos: os que estão em crescimento em determinado momento, dado que serão esses folículos que podem potencialmente ser recrutados para o processo de maturação.¹⁴

No entanto, o termo usado ao longo deste trabalho será “reserva ovárica”, compreendendo todo o pool de folículos da mulher (quer os em crescimento quer os quiescentes).

Ao longo do tempo, têm sido propostos e desenvolvidos vários possíveis marcadores. O marcador ideal será aquele que tenha a melhor sensibilidade e especificidade, deve ser reprodutível e com a menor variabilidade possível (quer intra quer interciclo).¹³

Contudo, os biomarcadores atuais não conseguem avaliar toda a pool de folículos primordiais, mas sim apenas os que estão em crescimento, passíveis de serem estimulados e posteriormente fecundados.¹⁴

Como principal objetivo, a realização dos testes de reserva ovárica visam identificar uma reserva ovárica diminuída e seguidamente proporcionar as melhores estratégias de tratamento individualizadas para cada caso.^{13, 15}

Como existem estas limitações em termos de biomarcadores, precisa-se de recorrer a todo o contexto clínico, obtendo uma informação o mais fidedigna da função ovárica.

Na colheita inicial de dados, pode-se sumariamente questionar alguns fatores de risco para uma reserva ovárica diminuída: idade reprodutiva avançada (>35 anos), história familiar de menopausa precoce, condições genéticas conhecidas, condições clínicas que provoquem dano ovárico (doença inflamatória pélvica, endometriose, entre outros), cirurgia prévia aos ovários, ooforectomia, antecedentes de neoplasia tratada com agentes gonadotóxicos ou irradiação da região pélvica, antecedentes de patologias médicas cuja terapêutica é realizada com agentes gonadotóxicos e consumo de tabaco.¹³

Seguidamente serão abordados alguns dos marcadores mais importantes:

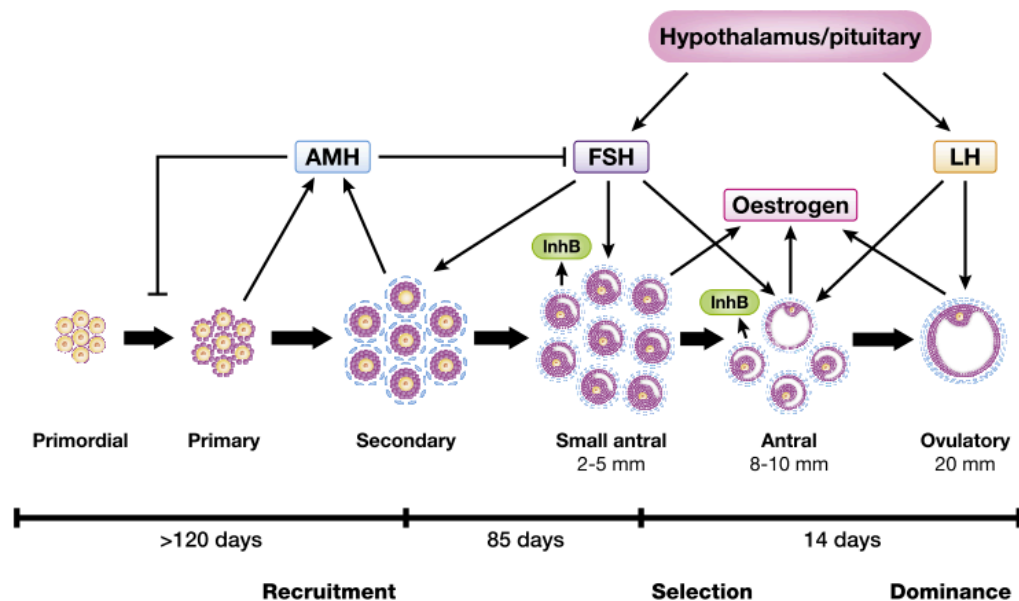


Figura 1 - Processo de maturação de oócitos (retirado do artigo nº26)

FSH (Follicle-Stimulating Hormone)

A FSH foi a primeira a ser utilizada como teste de reserva ovária em 1988.¹⁶

Para a obtenção do valor basal de FSH, esta é habitualmente medida ao 3º dia do ciclo menstrual. Os valores em idade fértil não devem estar demasiado elevados, uma vez que a sua elevação nessa fase poderá indicar alguma patologia subjacente. É necessário ter em atenção que, substratos semelhantes à FSH podem induzir efeitos idênticos, alterando os valores obtidos na sua medição. Por sua vez existem variações interpessoais e interciclos, o que não ajuda no estabelecimento do valor basal. Por outro lado, é um marcador que apresenta alterações muito tardiamente, ou seja, só há um aumento do seu valor próximo de haver uma falência, o que não é um bom preditor a longo prazo.¹⁷

Portanto, um único valor de FSH não é suficiente para uma avaliação eficaz, uma vez que é necessário ter em conta a sua variabilidade. Se o valor de FSH se encontra elevado tem uma boa especificidade, no entanto poderá ser apenas um falso positivo, especialmente se utilizado em populações de baixo risco. Há ainda que ter em atenção

qual o teste de medição que é utilizado para que medições entre testes diferentes não interfiram com os resultados obtidos.¹⁵

Relativamente à utilização deste marcador, é conhecido desde há muito tempo que a FSH aumenta em resposta a uma diminuição da responsividade por parte do ovário.¹⁸

No entanto, os vários estudos que têm sido realizados visam compreender e encontrar outras utilidades para a FSH, nomeadamente como resposta a terapêuticas de fertilização in vitro (FIV).

Bishop et al, verificou que em mulheres com diminuição da reserva ovárica sob FIV não havia quaisquer aumentos do número de abortos. A elevação de FSH apenas se associou a maior risco de aborto em mulheres mais velhas.¹⁹

Segundo Gingold et al, a FSH máxima registada é o melhor preditor de outcomes reprodutivos (em técnicas de fertilização in vitro) em comparação com a FSH máxima basal ou a FSH do ciclo em causa. No entanto, a grande limitação aqui é a espera do “melhor mês possível”, o que é uma grande incerteza, uma vez que se for uma mulher em idade reprodutiva avançada (>35anos) o importante é abordar a situação o mais breve possível.²⁰

No estudo de Tilborg et al, em FIV realizaram uma comparação entre o uso de diferentes protocolos na estimulação ovárica, um braço do estudo com o uso da dose standard de FSH e outro com doseamento individualizado de FSH baseado na contagem de folículos antrais (AFC). O que acabaram por concluir é que não havia aumento nos outcomes em termos de taxa de nados vivos nem na redução de custos das respetivas terapêuticas.²¹

Num outro estudo, foi feita uma comparação com a hormona anti-mulleriana (AMH), onde a FSH se demonstrou igualmente específica. No entanto, a AMH conseguia ser mais sensível e ter um valor preditivo negativo mais elevado. Quanto ao valor preditivo positivo, este demonstrou ser semelhante entre ambos os testes.²²

Estradiol

O estradiol é uma hormona esteróide produzida quer pelos folículos ováricos, mas também por outros tecidos, nomeadamente pelo tecido adiposo, fígado, suprarrenal, tecido mamário e tecido neural, pelo que nunca deve ser um marcador medido isoladamente, uma vez que não é específico do ovário. Pode ser útil, mas sempre em conjugação com outros marcadores/hormonas.¹⁸

Este apresenta oscilações ao longo do ciclo com um pico na fase folicular tardia e a meio da fase lútea, sendo habitualmente medido por imunoensaio ao mesmo tempo que a FSH, ou seja, ao 3º dia do ciclo.¹⁷

Por outro lado, o estradiol pode apresentar alterações dos seus valores por múltiplas patologias médicas, pela toma de glucocorticoides, pela toma de hormonas sexuais esteroides e outras substâncias como o clomifeno, letrozole, agonistas e antagonistas da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), entre outros.

Por todas as razões mencionadas previamente, o estradiol basal não deve ser usado isoladamente como marcador de reserva ovária.¹⁵

CCCT (Clomiphene Citrate Challenge Test)

O CCCT foi utilizado em 1989 pela primeira vez, mas logo rapidamente se percebeu que não era economicamente rentável.¹⁶

Este teste combina a medição de FSH e estradiol antes da administração de clomifeno, com uma posterior medição de FSH pós-clomifeno. Sumariamente, o clomifeno é um modulador seletivo do recetor dos estrogénios (SERM) que inibe o feedback negativo do estradiol no hipotálamo. Ao ter este efeito no estradiol, há um aumento da FSH, que por sua vez estimula o recrutamento folicular (daí o seu uso na indução da ovulação).^{15,}

¹⁷

A medição é feita da seguinte forma: a FSH e estradiol são medidos no 3º dia de ciclo e são administrados 100 mg de clomifeno per os desde o 5º até ao 9º dia de ciclo. Depois é repetida a medição de FSH no 10º dia do ciclo. Não é o método ideal, no entanto

poderá ajudar a diferenciar uma reserva ovárica normal de uma diminuída em pacientes com uma função borderline.¹⁵

Se o valor de FSH ao 10º dia de ciclo estiver anormalmente elevado é sugestivo de diminuição da reserva ovárica. De facto, é um teste que tem as suas limitações, não só porque acaba por ser uma conjugação dos marcadores acima referidos, mas também ao ser um teste provocativo, implica alguns encargos tais como múltiplas avaliações e deslocações por parte da pessoa sujeita ao tratamento, em dias específicos do ciclo, algo que é mais difícil principalmente em pessoas com ciclos irregulares.¹³

Inibina B

Este teste começou a ser utilizado em 1997.¹⁶

Em termos de mecanismo de ação é muito similar à AMH, que será abordada mais à frente, sendo também uma glicoproteína secretada por folículos pré-antrais e antrais e nos quais os seus níveis plasmáticos vão diminuindo com a idade. A inibina B tem um papel importante na regulação negativa da secreção de FSH a nível da hipófise. No entanto, a inibina não é um bom preditor da reserva ovárica uma vez que o aumento dos seus níveis plasmáticos ocorre devido ao desenvolvimento do folículo dominante e não devido aos restantes folículos.^{13, 17}

Aquando da sua medição, há que ter em atenção que os valores oscilam ao longo do ciclo com um pico na fase folicular inicial/precoc, assim como na ovulação. Portanto, é habitualmente medido entre o 2º - 5º dias do ciclo. Para além das variações intra-ciclo, também podem existir variações inter-ciclos. Por ter uma sensibilidade e especificidade menor do que outros testes, é provável que haja uma sobrevalorização de uma reserva ovárica diminuída. Alguns autores, propõem a combinação deste com outros métodos. No entanto, a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva é de opinião que a associação de vários testes não melhora a acuidade diagnóstica.^{17, 18}

Quando usado em doentes sob terapêutica gonadotóxica, nomeadamente quimioterapia, os valores de inibina B e também de estradiol permanecem inalterados, enquanto que a AMH diminui abruptamente e existe um ligeiro aumento da FSH.¹⁸

De forma genérica, os seus valores diminuem de forma mais acentuada cerca de 4 anos antes da menopausa. No entanto, em mulheres em menopausa esta serve como um bom marcador de follow-up em tumores das células da granulosa, apresentando-se aumentada em 89% dos casos, podendo ainda ser útil em alguns tipos de células epiteliais do ovário.¹⁷

Volume ovárico

O volume ovárico total compreende todos os folículos, estroma e respetiva vascularização, onde a contribuição de cada um destes componentes poderá ser diferente de acordo com múltiplos fatores: variações de mulher para mulher, da própria idade, da história ginecológica, da duração do ciclo menstrual e ao longo do mesmo, pelo uso de hormonas exógenas e por múltiplas patologias que podem provocar alterações. Portanto, o melhor é associar a contagem de folículos antrais a este método. A sua medição é realizada através de ecografia, onde um aumento dos ovários (>10 cm³) pode sugerir uma síndrome de ovários poliquísticos (SOP). Associada à ecografia simples pode ser usado doppler e modo 3D, por exemplo.¹⁷

Apesar das alterações do volume ovárico com a idade (diminuição ao longo da idade fértil) serem concordantes com a diminuição do número de folículos, o volume ovárico correlaciona-se com a resposta do próprio ovário à estimulação, não sendo possível fazer qualquer previsão acerca de uma eventual conceção. Por todas estas razões, não deverá ser um método para uso isolado.¹³

AFC (Antral Follicle Count)

Também no ano de 1997, a AFC começou a ser utilizada como marcador na área da reprodução medicamente assistida.¹⁶

Os folículos presentes podem ser visualizados através de ultrassonografia, onde a quantidade vai diminuindo ao longo do tempo, ou seja, com a diminuição da reserva ovárica natural da idade. A contagem pode ser feita em qualquer altura do ciclo, quer as mulheres usem ou não método contraceptivo. No entanto, idealmente deverão ser medidos entre o 2º a 5º dias do ciclo, ou seja, na fase folicular precoce em que os

folículos terão na sua maioria entre 2 e 10 mm, dando uma ideia sumária da probabilidade de se vir a ter um óócito maduro. A variação da AFC foi avaliada durante todo o ciclo menstrual e onde se verificaram diferenças significativas foi durante a fase folicular precoce e a tardia. Apesar desta variação, o protocolo de estimulação ovárica em FIV não é afetado significativamente quer a medição seja feita na fase precoce ou tardia.²³

A contagem normal dependerá da idade da própria mulher. Em casos específicos como é na síndrome dos ovários poliquísticos (que é das patologias mais frequentes em que há uma alteração da contagem de folículos) são utilizados os critérios de Rotterdam, onde ecograficamente se deverá ter 12 ou mais folículos em cada ovário medindo entre 2 a 9 mm de diâmetro e/ou aumento do volume ovárico (>10 mL) – com 75% de sensibilidade e 98% de especificidade^{13, 17}

No estudo de Greenwood et al, foram comparados os valores de AMH e AFC entre mulheres inférteis e controlos saudáveis da mesma idade. Em termos de resultados obtidos, verificaram que os marcadores não diferiam entre os 2 grupos comparados. Portanto, os atuais marcadores não conseguem fazer uma distinção entre uma população fértil e infértil com características demográficas semelhantes.²⁴

O grupo de Bozdag et al no seu estudo tinham como objetivo a construção de um normograma utilizando a AFC em mulheres entre os 20 e os 50 anos de idade com ciclos menstruais regulares. Este tipo de ferramentas pretende ser útil na caracterização do status de reserva ovárica de uma mulher em determinada idade reprodutiva de uma forma gráfica e facilmente acessível. No entanto, também existem muitos contras na utilização destes normogramas, nomeadamente a sua validação para as diferentes populações de mulheres em idade fértil e sendo necessário também a inclusão de mulheres que tenham alterações do padrão menstrual, incluindo as mulheres com ciclos irregulares ou outras patologias que afetem o normal funcionamento do ovário.²⁵

A AFC e a AMH têm sido nos últimos anos, os dois marcadores mais utilizados atualmente. Cada vez mais são uma útil ferramenta nas técnicas de FIV, nomeadamente a nível da estimulação ovárica, no entanto, com resultados contraditórios face à previsão da taxa de conceção.^{15, 26}

No estudo de Keane et al, tanto a AMH como a AFC influenciam os outcomes de gravidez e de taxa de nascidos vivos em FIV. Já a taxa de abortos parece estar relacionada com a AFC, mas essa correlação parece ser estatisticamente mais forte com a idade. Quanto ao número de oócitos colhidos estes estão positivamente correlacionados com o aumento da AFC e AMH, enquanto que a taxa de utilização de oócitos e embriões está negativamente correlacionado.²⁷

Wenners et al, tiveram como objetivo o estudo da afeção dos marcadores de reserva ovárica em doentes jovens, neste caso em mulheres com neoplasia da mama sujeitas a quimioterapia com antraciclinas + taxanos ou sem o uso de quimioterapia baseada nestas substâncias. O que se verificou foi uma descida marcada da AMH e AFC depois da quimioterapia e no qual havia um período de pelo menos 24 meses para atingirem valores prévios à terapêutica. A FSH e LH aumentavam nos períodos pós QT com recuperação progressiva ao longo do tempo.²⁸

Por sua vez, Shandley e a sua equipa fizeram uma comparação dos marcadores de fertilidade e de reserva ovárica em mulheres com e sem síndrome de ovários poliquísticos, pós neoplasia e respetivos controlos sem neoplasia (4 grupos em comparação direta). A conclusão a que chegam é que no grupo após o tratamento da neoplasia e apesar da elevação de AMH e AFC, as mulheres com SOP têm menos probabilidade de atingirem os seus objetivos reprodutivos em comparação com as sobreviventes sem SOP.²⁹

Foram ainda realizadas medições de AMH e de AFC como marcadores de aneuploidias – independentemente do desfecho da gestação (nado vivo ou morto). A AMH e a AFC de acordo com a faixa etária da grávida foram comparadas com os diferentes grupos citogenéticos, entre eles: cariótipo normal, trissomias autossómicas e outras alterações cromossómicas. O que se verificou apenas nas trissomias autossómicas, foi uma mediana de AFC acima da mediana de idade materna em cerca de 3 a 5 anos, não se verificando o mesmo para a AMH.³⁰

AMH (Anti-mullerian hormone)

Inicialmente em 1992, a AMH foi associada aos tumores ováricos cuja a origem era em células da granulosa, com uma elevação deste marcador em 76 a 93% dos casos. Surgia

aqui um marcador que ajudava não só ao diagnóstico assim como ao follow-up de eventuais recidivas tumorais.¹⁸

Por sua vez, a AMH foi introduzida como marcador de reserva ovárica apenas 10 anos mais tarde.¹⁶

A sua produção é feita essencialmente por células da granulosa. A expressão de AMH é mais elevada na fase em que os folículos têm até 4 mm de tamanho, deixando de ser expresso quando o folículo mede entre 4 a 8 mm. Pensa-se que o papel da AMH é seleccionar o folículo dominante aquando do recrutamento dos folículos pré-antrais.¹⁷ Quanto ao pico de produção máximo da AMH, este é atingido por volta dos 23-25 anos refletindo o período mais fértil ao longo da vida reprodutiva da mulher.^{16, 18} Os valores séricos de AMH começam a diminuir cerca de 15 anos antes da menopausa, onde esse decréscimo é mais evidente nos últimos 5 anos de idade fértil.¹⁷

A sua medição pode ser realizada por imunoensaio em qualquer fase do ciclo menstrual. Há ainda que ter em atenção os percentis ajustados à idade (dado que os valores variam de acordo com a idade da mulher). Com o uso de contraceptivos orais pode haver uma diminuição dos valores de AMH em 11%, e na gravidez em 17% (sendo, no entanto, ambas causas reversíveis de decréscimo de AMH). É das técnicas que apresenta menos limitações comparativamente com outras.¹⁷

Aquando da sua utilização nas técnicas de FIV, se AMH¹⁷:

- < 0,5 ng/mL, obtém-se normalmente < 3 folículos
- Entre 0,5 – 1 ng/mL: resposta baixa
- Entre 1 – 3,5 ng/mL: resposta normal
- >3,5 ng/mL: hiper-resposta (maior risco de hiperestimulação ovárica)

Tal como no estudo de Greenwood mencionado acima (vide o capítulo sobre AFC), também Bozkurt et al faz uma comparação dos valores de AMH entre uma população de mulheres férteis e outra de mulheres inférteis. Usam vários marcadores, comparando em categorias de idades (<30, 30-39 e >40 anos). O que concluíram é que não existem diferenças estatisticamente significativas entre grupos, o que se depreende que a reserva ovárica diminui diretamente pela idade e não pela infertilidade em si.³¹

Em termos de limitações do uso deste marcador há que ter em atenção a variabilidade entre os vários ensaios disponíveis no mercado e a dificuldade posterior na comparação de resultados.¹³

No estudo de Plociennik et al, foram comparados 4 imunoensaios ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) manuais, no qual se chegou às seguintes conclusões: o dia de medição da AMH ao longo do ciclo menstrual não afetou os valores obtidos; os valores variam muito consoante o ensaio utilizado, onde até a taxa de declínio de AMH com a idade é diferente.³²

No estudo de Safier et al, foi utilizada a AMH como teste de screening da reserva ovárica em mulheres em risco de SOP. As mulheres com valores de AMH superiores ao cut-off definido (neste caso $>4,7$ ng/mL), foram convidadas para um exame físico e realização de ecografia endovaginal. Do follow-up realizado em 80% (n=12) dos casos confirmou-se o diagnóstico de SOP, através dos critérios de Rotterdam. Portanto, os níveis de AMH quando elevados, podem ajudar na identificação de mulheres em risco de desenvolverem SOP.³³

Xu et al, concluíram no seu estudo que a AMH é o melhor marcador para previsão da resposta do ovário em ciclos de FIV com o uso de antagonista da GnRH - protocolo mais utilizado nas FIV atualmente - não sendo um bom marcador de previsão de gravidez (onde a idade permanece como o melhor marcador).³⁴

Também Zebitay et al, tiveram como objetivo avaliar o papel dos marcadores de reserva ovárica na predição da gravidez e da taxa de transferência de embriões em mulheres com uma resposta baixa aos tratamentos de FIV. O número de oócitos utilizáveis correlacionou-se positivamente com a AMH e AFC e negativamente com a FSH e a idade. Os valores médios de AMH foram mais baixos no grupo de mulheres em que não houve transferência de embriões. Concluíram ainda que a AMH medida no 3º dia de ciclo pode prever a transferência de embriões com uma sensibilidade de 96% e uma especificidade de 35%.³⁵

Os níveis de AMH podem também servir como um marcador de follow-up e preditor da ocorrência de amenorreia relacionada com a quimioterapia. Isto é particularmente importante na neoplasia da mama, uma vez que é o tipo de cancro mais frequente em mulheres em idade reprodutiva. Apesar da heterogeneidade de follow-up, os valores de

AMH pós QT na neoplasia da mama, podem manter-se baixos e estáveis até 5 anos depois da terapêutica.³⁶ Verificaram 2 padrões diferentes em mulheres jovens tratadas para neoplasia da mama (independentemente dos marcadores hormonais poderem ser diferentes) com o mesmo protocolo de quimioterapia: um padrão de recuperação rápida (< ou igual a 6 meses) e outro de recuperação lenta (>6 meses), onde o aumento de AMH (com utilização do imunoensaio picoAMH) no sangue precede ou ocorre em simultâneo com a recuperação dos ciclos menstruais.³⁷

Uma outra situação que tem vindo a ser investigada é o impacto que a contraceção oral tem nos marcadores de reserva ovárica. O grupo de Petersen et al, chegou aos seguintes resultados: diminuição de AMH, AFC e volume ovárico em 19%, 18% e 50% respetivamente, em comparação com mulheres não utilizadoras de contraceção oral. Apesar destes resultados preliminares, o fundamental é saber quais as reais implicações desta diminuição, mais precisamente nos outcomes de fertilidade.³⁸

Outras variáveis têm também tido particular interesse em termos do seu impacto nos marcadores de reserva ovárica. A paridade foi investigada e efetuada uma comparação com nulíparas. Moini et al utilizou a FSH, AFC, AMH e volume ovárico, comparando múltiparas com nulíparas. As múltiparas apresentavam um aumento de todos os parâmetros, exceto a FSH que não variou significativamente.³⁹

A AMH em relação a outros marcadores, possui uma série de vantagens, entre elas a baixa variabilidade intra e inter-ciclos, a aplicabilidade a todos os pacientes, ser um teste independente do operador, conseguir fazer uma predição de hiper-resposta em casos de FIV, prever a utilização de oócitos, permitindo no fundo um tratamento individualizado. No entanto, é um teste ainda dispendioso, que é um fator que deve ter sido em conta, na sua utilização regular na prática clínica.¹⁸

As várias revisões que tem publicadas demonstram a AMH como o marcador atual mais promissor para a previsão da idade natural de menopausa. Contudo, os extremos de idade de menopausa têm mais limitações, uma vez que, na sua maioria haverá múltiplas causas para que esta ocorra ou tão precoce ou tardiamente.⁴⁰

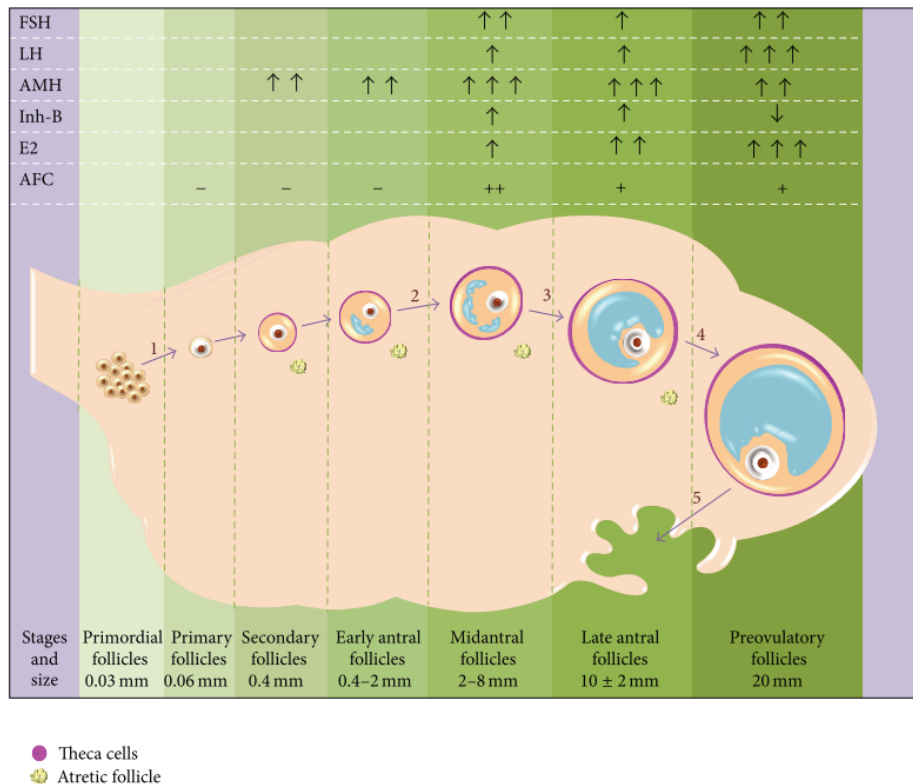


Figura 2 - Esquema de produção/visualização dos diversos marcadores ao longo do crescimento folicular (retirado do artigo nº18)

Outros marcadores

Ao longo de toda a investigação à volta deste tema, têm sido propostos outros marcadores passíveis de ser utilizados na prática corrente num futuro próximo.

Como não poderia deixar de ser, os marcadores genéticos são uma parte considerável da investigação com uso de genes como o FMR1 e os BRCA 1 e 2.

A pré-mutação do gene FMR1 tem vindo a ser associada a insuficiência ovárica prematura e a diminuição da reserva ovárica, contudo a natureza desta associação ainda não foi devidamente clarificada, principalmente em termos dos seus mecanismos fisiopatológicos.⁴¹

Muitos estudos têm tido resultados contraditórios quanto às mulheres portadoras da mutação do gene BRCA2. Alguns estudos chegam à conclusão que a AMH está diminuída, outros não encontram diferenças estatisticamente significativas (quando comparadas com controlos saudáveis). O que se têm verificado é que estas mulheres

têm uma menopausa mais precoce, colocando a hipótese que estas teriam uma diminuição da função ovárica pelo facto de haver uma depleção do pool primordial de folículos devido a danos/quebras no DNA. Ora, o BRCA tem como função a manutenção dos telómeros, o que por sua vez se houver um encurtamento dos mesmos, este leva a uma apoptose prematura (com envelhecimento precoce do ovário) e subsequentemente a uma senescência reprodutiva.^{42, 43}

Para além destes, tem-se também falado de uma possível autotransplantação de tecido ovárico⁶, nomeadamente em casos de neoplasia pré-quimioterapia com o recurso à criopreservação, estando ainda numa fase muito inicial de investigação.⁴⁴

Outros possíveis parâmetros poderiam passar pela medição dos níveis de espécies reativas de oxigénio (ROS) no líquido folicular. O que se coloca como uma questão pertinente é por exemplo quais os valores considerados normais que devem estar presentes e o seu respetivo significado.⁴⁵

Tong et al propõe pela primeira vez que as medições dos níveis de melatonina no líquido folicular estejam relacionadas com a qualidade e quantidade de oócitos, sugerindo ser um possível preditor de outcomes nas FIV num futuro próximo.⁴⁶

Já no estudo de La Barca, o objetivo era verificar a existência de um perfil metabólico do líquido folicular comparando mulheres com diminuição da reserva ovárica a mulheres com uma reserva ovárica normal. A finalidade aqui era assim definir uma “assinatura metabólica”, com uma possível diminuição de metabolitos e da atividade enzimática nas alterações da reserva ovárica.⁴⁷

O DNA mitocondrial é também uma proposta de biomarcador e coloca-se a transferência mitocondrial autóloga como um potencial tratamento para a função e resposta ováricas diminuídas. Ficam no ar, questões relativas a uma eventual passagem dessa informação genética às gerações futuras e a possibilidade de acumulação de mutações que deverão ser investigadas em eventuais futuros estudos.^{48, 49}

Por último, outra proposta passa pelo estudo dos nichos de células estaminais ováricas, que segundo Ye et al é devido ao declínio destes aglomerados que leva a uma diminuição da reserva ovárica e não devido à senescência das células germinativas.⁵⁰

Conclusões

O screening de rotina da diminuição da reserva ovárica / insuficiência ovárica prematura não deve ser efetuado em populações de baixo risco, uma vez que a evidência atual é insuficiente para sustentar tal prática (com consequente aumento do número de falsos positivos).¹⁵

As mulheres a ser testadas: devem ter mais de 35 anos, que não conseguem obter uma gravidez por um período de pelo menos 6 meses; mulheres que tiveram alguma cirurgia com envolvimento dos ovários ou outras patologias ginecológicas; sujeitas a QT e/ou RT; menopausa precoce na família, carga tabágica, ooforectomia prévia ou história familiar. Os testes mais consensuais em termos de utilização clínica no dia a dia é a FSH, estradiol, AMH e AFC. A relembrar que, mesmo que um teste identifique uma diminuição/insuficiência da reserva ovárica não significa que haja uma incapacidade absoluta de concepção futura, não sendo um impedimento total de acesso a tratamentos de fertilidade. Aliás, mulheres mais jovens podem apresentar uma reserva ovárica diminuída, mas ainda assim manter a qualidade de oócitos inalterada.^{13, 51}

Neste momento não existe um biomarcador perfeito, no entanto à data atual os marcadores mais promissores são a AMH e a AFC, complementando-se entre si.¹⁵

A grande questão na utilização destes marcadores é que estes não indicam qual a etiologia nem tranquilizam definitivamente as pacientes quanto a uma possível insuficiência ovárica prematura. Apenas auxiliam os clínicos no seu dia a dia, de forma a melhor conseguirem encaminhar a mulher/casal no seu objetivo reprodutivo, obtendo valor prognóstico, uma vez que a fertilidade varia de mulher para mulher (mesmo em idades similares). Há um longo caminho a percorrer em termos investigacionais, mas acredita-se que nos próximos anos haja um esclarecimento/aprofundamento das questões em causa.^{15, 17}

Bibliografia

- 1 – ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. Human Reproduction. 2016;31(5):926-937.
- 2 – Consenso Nacional sobre Menopausa 2016 [Internet]. Spginecologia.pt. 2017 [cited 7 December 2018]. Available from: http://www.spginecologia.pt/uploads/Consenso_Menopausa_2016.pdf
- 3 – Castelo-Branco C, Hernández-Angeles C. Early menopause: A hazard to a woman's health. Indian Journal of Medical Research. 2016;143(4):420 - 427.
- 4 – Flores V, Pal L. Managing Menopause by Combining Evidence With Clinical Judgement. Clinical Obstetrics and Gynecology. 2018;61(3):496 - 507.
- 5 – Luisi S, Orlandini C, Regini C, Pizzo A, Vellucci F, Petraglia F. Premature ovarian insufficiency: from pathogenesis to clinical management. Journal of Endocrinological Investigation. 2015;38(6):597-603.
- 6 – Torrealday S, Kodaman P, Pal L. Premature Ovarian Insufficiency - an update on recent advances in understanding and management. F1000Research. 2017;6:2069.
- 7 – Kruszyńska A, Słowińska-Srzednicka J. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a good predictor of time of menopause. Menopausal Review. 2017;16(2):47-50.
- 8 – Sullivan S, Sarrel P, Nelson L. Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause. Fertility and Sterility. 2016;106(7):1588-1599.
- 9 – Machura P, Grymowicz M, Rudnicka E, Pięta W, Calik-Ksepka A, Skórska J et al. Premature ovarian insufficiency – hormone replacement therapy and management of long-term consequences. Menopausal Review. 2018;17(3):135-138.
- 10 – Overview | Menopause: diagnosis and management | Guidance | NICE [Internet]. Nice.org.uk. 2015 [cited 7 December 2018]. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng23>
- 11 – Committee Opinion No. 698 Summary. Obstetrics & Gynecology. 2017;129(5):963-964.

- 12 – Podfigurna-Stopa A, Czyzyk A, Grymowicz M, Smolarczyk R, Katulski K, Czajkowski K et al. Premature ovarian insufficiency: the context of long-term effects. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2016;39(9):983-990.
- 13 – Committee Opinion No. 618. *Obstetrics & Gynecology*. 2015;125(1):268-273.
- 14 – Findlay J, Hutt K, Hickey M, Anderson R. What is the “ovarian reserve”? *Fertility and Sterility*. 2015;103(3):628-630.
- 15 – Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2015;103(3):e1-e9.
- 16 – Tal R, Seifer D. Ovarian reserve testing: a user’s guide. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2017;217(2):129-140.
- 17 – Parry J, Koch C. Ovarian Reserve Testing [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2016 [cited 16 December 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279058/>
- 18 – Jamil Z, Fatima S, Ahmed K, Malik R. Anti-Mullerian Hormone: Above and Beyond Conventional Ovarian Reserve Markers. *Disease Markers*. 2016;2016:1-9.
- 19 – Bishop L, Richter K, Patounakis G, Andriani L, Moon K, Devine K. Diminished ovarian reserve as measured by means of baseline follicle-stimulating hormone and antral follicle count is not associated with pregnancy loss in younger in vitro fertilization patients. *Fertility and Sterility*. 2017;108(6):980-987.
- 20 – Gingold J, Lee J, Whitehouse M, Rodriguez-Purata J, Sandler B, Grunfeld L et al. Maximum basal FSH predicts reproductive outcome better than cycle-specific basal FSH levels: waiting for a “better” month conveys limited retrieval benefits. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015;13(91).
- 21 – van Tilborg T, Oudshoorn S, Eijkemans M, Mochtar M, van Golde R, Hoek A et al. Individualized FSH dosing based on ovarian reserve testing in women starting IVF/ICSI: a multicentre trial and cost-effectiveness analysis. *Human Reproduction*. 2017;32(12):2485-2495.
- 22 – Alipour F, Rasekhjahromi A, Maalagh M, Sobhanian S, Hosseinpour M. Comparison of Specificity and Sensitivity of AMH and FSH in Diagnosis of Premature Ovarian Failure. *Disease Markers*. 2015;2015:1-4.

- 23 – Mavrelou D, Al Chami A, Talaulikar V, Burt E, Webber L, Ploubidis G et al. Variation in antral follicle counts at different times in the menstrual cycle: does it matter?. *Reproductive BioMedicine Online*. 2016;33(2):174-179.
- 24 – Greenwood E, Cedars M, Santoro N, Eisenberg E, Kao C, Haisenleder D et al. Antimüllerian hormone levels and antral follicle counts are not reduced compared with community controls in patients with rigorously defined unexplained infertility. *Fertility and Sterility*. 2017;108(6):1070-1077.
- 25 – Bozdag G, Calis P, Zengin D, Tanacan A, Karahan S. Age related normogram for antral follicle count in general population and comparison with previous studies. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2016;206:120-124.
- 26 – Fleming R, Seifer D, Frattarelli J, Ruman J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reproductive BioMedicine Online*. 2015;31(4):486-496.
- 27 – Keane K, Cruzat V, Wagle S, Chaudhary N, Newsholme P, Yovich J. Specific ranges of anti-Mullerian hormone and antral follicle count correlate to provide a prognostic indicator for IVF outcome. *Reproductive Biology*. 2017;17(1):51-59.
- 28 – Weners A, Grambach J, Koss J, Maass N, Jonat W, Schmutzler A et al. Reduced ovarian reserve in young early breast cancer patients: preliminary data from a prospective cohort trial. *BMC Cancer*. 2017;17(1):632.
- 29 – Shandley L, Fothergill A, Spencer J, Mertens A, Cottrell H, Howards P. Impact of cancer treatment on risk of infertility and diminished ovarian reserve in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. 2018;109(3):516-525.e1.
- 30 – Grande M, Borobio V, Bennasar M, Stergiotou I, Mercadé I, Masoller N et al. Role of ovarian reserve markers, antimüllerian hormone and antral follicle count, as aneuploidy markers in ongoing pregnancies and miscarriages. *Fertility and Sterility*. 2015;103(5):1221-1227.e2.
- 31 – Bozkurt B, Erdem M, Mutlu M, Erdem A, Guler I, Mutlu I et al. Comparison of age-related changes in anti-Müllerian hormone levels and other ovarian reserve tests between healthy fertile and infertile population. *Human Fertility*. 2016;19(3):192-198.

- 32 – Plociennik L, Nelson S, Lukaszuk A, Kunicki M, Podfigurna A, Meczekalski B et al. Age-related decline in AMH is assay dependent limiting clinical interpretation of repeat AMH measures across the reproductive lifespan. *Gynecological Endocrinology*. 2017;34(2):115-119.
- 33 – Safier L, Grossman L, Chan C, Sauer M, Lobo R, Douglas N. Use of anti-Müllerian hormone testing during ovarian reserve screening to identify women at risk of polycystic ovary syndrome. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2016;135(1):73-76.
- 34 – Xu H, Zeng L, Yang R, Feng Y, Li R, Qiao J. Retrospective cohort study: AMH is the best ovarian reserve markers in predicting ovarian response but has unfavorable value in predicting clinical pregnancy in GnRH antagonist protocol. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2016;295(3):763-770.
- 35 – Zebitay A, Cetin O, Verit F, Keskin S, Sakar M, Karahuseyinoglu S et al. The role of ovarian reserve markers in prediction of clinical pregnancy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2017;37(4):492-497.
- 36 – Fréour T, Barrière P, Masson D. Anti-müllerian hormone levels and evolution in women of reproductive age with breast cancer treated with chemotherapy. *European Journal of Cancer*. 2017;74:1-8.
- 37 – Decanter C, Cloquet M, Dassonneville A, D'Orazio E, Mailliez A, Pigny P. Different patterns of ovarian recovery after cancer treatment suggest various individual ovarian susceptibilities to chemotherapy. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018;36(6):711-718.
- 38 – Birch Petersen K, Hvidman H, Forman J, Pinborg A, Larsen E, Macklon K et al. Ovarian reserve assessment in users of oral contraception seeking fertility advice on their reproductive lifespan. *Human Reproduction*. 2015;30(10):2364-2375.
- 39 – Moini A, Hedayatshodeh M, Hosseini R, Rastad H. Association between parity and ovarian reserve in reproductive age women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2016;207:184-187.

- 40 – Depmann M, Broer S, van der Schouw Y, Tehrani F, Eijkemans M, Mol B et al. Can we predict age at natural menopause using ovarian reserve tests or mother's age at menopause? A systematic literature review. *Menopause*. 2016;23(2):224-232.
- 41 – Eslami A, Farahmand K, Totonchi M, Madani T, Asadpour U, Zari Moradi S et al. FMR1 premutation: not only important in premature ovarian failure but also in diminished ovarian reserve. *Human Fertility*. 2016;20(2):120-125.
- 42 – Johnson L, Sammel M, Domchek S, Schanne A, Prewitt M, Gracia C. Antimüllerian hormone levels are lower in BRCA2 mutation carriers. *Fertility and Sterility*. 2017;107(5):1256-1265.e6.
- 43 – van Tilborg T, Derks-Smeets I, Bos A, Oosterwijk J, van Golde R, de Die-Smulders C et al. Serum AMH levels in healthy women from BRCA1/2 mutated families: are they reduced?. *Human Reproduction*. 2016;31(11):2651-2659.
- 44 – Perdrix A, Saint-Ghislain M, Degremont M, David M, Khaznadar Z, Loeb A et al. Influence of adjuvant chemotherapy on anti-Müllerian hormone in women below 35 years treated for early breast cancer. *Reproductive BioMedicine Online*. 2017;35(4):468-474.
- 45 – Elizur S, Lebovitz O, Orvieto R, Dor J, Zan-Bar T. Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age. *Gynecological Endocrinology*. 2014;30(10):705-707.
- 46 – Tong J, Sheng S, Sun Y, Li H, Li W, Zhang C et al. Melatonin levels in follicular fluid as markers for IVF outcomes and predicting ovarian reserve. *Reproduction*. 2017;153(4):443-451.
- 47 – de la Barca J, Boueilh T, Simard G, Boucret L, Ferré-L'Hotellier V, Tessier L et al. Targeted metabolomics reveals reduced levels of polyunsaturated choline plasmalogens and a smaller dimethylarginine/arginine ratio in the follicular fluid of patients with a diminished ovarian reserve. *Human Reproduction*. 2017;32(11):2269-2278.
- 48 – May-Panloup P, Boucret L, Chao de la Barca J, Desquiere-Dumas V, Ferré-L'Hotellier V, Morinière C et al. Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles. *Human Reproduction Update*. 2016;22(6):725-743.

49 – Wang T, Zhang M, Jiang Z, Seli E. Mitochondrial dysfunction and ovarian aging. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2017;77(5):e12651.

50 – Ye H, Zheng T, Li W, Li X, Fu X, Huang Y et al. Ovarian Stem Cell Nests in Reproduction and Ovarian Aging. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;43(5):1917-1925.

51 – Podfigurna A, Lukaszuk K, Czyzyk A, Kunicki M, Maciejewska-Jeske M, Jakiel G et al. Testing ovarian reserve in pre-menopausal women: why, whom and how?. *Maturitas*. 2017;109:112-117.